Антинуклеар эсрэгбие илрүүлэх фермент холбоот эсрэгбиеийн урвалын цомгийн загварыг боловсруулсан судалгаа

Д.Мөнхжаргал[1], Т.Өлзийхүү[1], Б.Урангоо[1], М.Ариунзаяа[1], С.Хашчулуун[1], С.Чимидцэрэн[1], Э.Хөлгөн[2], Э.Маргад-Эрдэнэ[2], Ч.Гансүх[1], Т.Хонгорзул[1,3]

[1]АШУҮИС, Био-Анагаахын сургууль, Дархлаа судлалын тэнхим
[2]УНТЭ, Хэрх үе судлал, үе сэргээх төв
[3]АШУҮИС, Био-Анагаахын хүрээлэн, Иммунобиологийн лаборатори
Цахим шуудан: moogii.monkhjargal04@gmail.com, Утас: 99303080

Түлхүүр үг:

Шугаман эс
Эсэд суурилсан ФХЭБУ
Аутоиммун
HEp-2 эс

Товч утга:

Үндэслэл: ANA (Anti-Nuclear Antibody) нь өөрийн эсийн ДНХ, РНХ, гистон уураг зэрэгт чиглэсэн аутоиммун механизмаар үүсдэг аутоэсрэгбие юм. Ийлдсэнд агуулагдах ANA-г илрүүлэх нь аутоиммун эмгэгийн үед оношилгооны маркер болдог бөгөөд ФХЭБУ-ын in-house оношлуурын цомгийг боловсруулах нь эмнэлзүйн болон эдийн засгийн ач холбогдолтой. **Зорилго:** Ийлдсийн ANA илрүүлэх ФХЭБУ-ын in-house цомгийн загварыг боловсруулах зорилго дэвшүүлэв. **Арга, аргачлал:** HEp-2 гэх олон төрлийн антигенийг агуулсан хавдрын шугаман эсийг антиген болгон ашигласан бөгөөд эсэд суурилсан ба эсээс ялгасан уургийг ашиглах гэсэн хоёр төрлийн арга зүйгээр туршилт судалгааг хийв. Эсийг бүхлээр ашиглахдаа 1 үүрэнд 20,000 эс байхаар тооцож хийсэн бол эсээс ялгасан уургийг 1 үүрэнд 5 мкг/мл байхаар тооцож анхдагч ба хоёрдогч эсрэгбиеэр үйлчлэн OD (Optical Density) утгыг тодорхойлов. Анхдагч эсрэгбие болох оношлуураар ANA эерэг эсвэл сөрөг тодорхойлогдсон ийлдсийг УНТЭ-ийн хэрх үе судлал, үе сэргээх төвийг түшиглэн цуглуулж хяналт болгон ашиглав. Хоёр төрлийн арга зүйгээр боловсруулж буй ФХЭБУ-ын үр дүнд антигенийг урвалын самбарт бэхлэх, өвөрмөц бус холболтыг саатуулах, анхдагч ба хоёрдогч эсрэгбиеэр үйлчлэх концентраци, хугацаа зэрэг нөлөөлж байв. Эерэг болон сөрөг хяналтын OD утгын зөрүүг нэмэгдүүлж буй протоколыг боловсруулав. **Үр дүн:** Уураг ашигласан загварын үр дүнгийн эерэг болон сөрөг хяналтын утгын зөрүү ойрхон тодорхойлогдсон ба статистик ач холбогдол бүхий ялгаагүй ($p>0.05$) байв. HEp-2 эсийн уургийг ашигласан цомгийн эерэг хяналтын OD утга 3 ба 5 дахь туршилтад өндөр тодорхойлогдов. Эерэг болон сөрөг хяналтын OD утгын зөрүүг нэмэгдүүлж буй протоколын оновчтой нөхцөлийг боловсруулав. Үүнд: Урвалын хавтанд бэхлэгдэн ургасан эсийг 1:1 метанол-ацетон ашиглан өрөөний температурт 20 минут бэхжүүлнэ. Эсийн эндоген пероксидазыг 0.1%-ийн quenching буферээр хориглож, 10%-ийн тугалын ийлдсийн альбуминаар өвөрмөц бус холболтыг саатуулна. Анхдагч эсрэгбиеийг 1:300-аар 30 минут, хоёрдогч эсрэгбиеийг 1:20,000-аар 1 цаг үйлчилнэ. HEp-2 эсийг бүхлээр ашиглахад эерэг ба сөрөг хяналтын утгын зөрүү статистик ач холбогдол бүхий ялгаатай ($p<0.0001$) байв. **Дүгнэлт:** HEp-2 эсийг бүхлээр нь ашиглан эсэд суурилсан арга зүйгээр ийлдсийн ANA-г илрүүлэх ФХЭБУ-ын in-house цомгийн технологийг боловсруулав.

Үндэслэл: Дархлаа тогтолцооны хэвийн үйл ажиллагаа алдагдсаны улмаас ANA (Antinuclear Antibody) болон бусад уургийн бүтээгдэхүүн үүсэж, өөрийн бие махбодын эсийн бүтцийн хэсэг рүү довтолсноор аутоиммун эмгэг үүсдэг[1,2]. Ауто эсрэгбиеийн шалтгаантай 80 гаруй төрлийн өвчин эмгэг үүсдэг байна[3]. Тархалтын хувьд 5-500:100,000 байдаг бол манай орны хувьд аутоиммун эмгэгийн

тархалтын судалгаа хангалттай хийгдээгүй ба 2014–2018 оны хооронд 1145 тохиолдол бүртгэгджээ[4]. ANA-г шинжлэхийн тулд эмнэлзүйн лабораторид арилжааны ANA ELISA оношилгооны цомгийг түгээмэл хэрэглэдэг ба үйлдвэрлэгчээс хамааран дунджаар 9-17 төрлийн цэвэршүүлсэн антиген агуулсан байдаг[5]. Бид судалгаандаа HEp-2 (Human Epidermoid Carcinoma) гэх бөөмийн болон цитоплазмын 150 гаруй антиген агуулсан хавдрын шугаман эсийг антиген болгон ашигласан[6]. Энэ нь нэг дор олон төрлийн бөөмийн эсрэг үүссэн эсрэгбиеийг илрүүлэх боломжтойгоос гадна эдийн засаг, цаг хугацааны хэмнэлттэй, оношилгооны ач холбогдолтой учир in-house ANA ELISA цомгийн загварыг боловсруулах үндэслэл болж байна.

Зорилго: Ийлдсийн ANA-г илрүүлэх ФХЭБУ-ын in-house цомгийн загварыг боловсруулах.

Арга, аргачлал: Энэхүү судалгааг АШУҮИС-ийн ШУТДС-ийн санхүүжилттэй хэрэгжсэн "Аутоиммун эмгэгийн оношилгооны ФХЭБУ-ын оношлуур үйлдвэрлэх" төслийн хүрээнд Био-Анагаахын хүрээлэнгийн Эсийн өсгөврийн лабораторийг түшиглэн туршилт судалгааны загвараар хийж гүйцэтгэв. АШУҮИС-ийн Судалгааны ёс зүйн хяналтын хорооны 2023 оны 04 сарын 21-ний өдрийн №2023/03-04 тоот хурлаар төслийн судалгааг эхлүүлэх ёс зүйн зөвшөөрөл авсан. HEp-2 гэх хавдрын шугаман эсийг ОХУ-ын Новосибирск дэх эсийн сангаас захиалан авч шууд бус ФХЭБУ-ын цомгийн загварыг боловсруулав. Шугаман эсийг дулбеккогийн (DMEM) эсийн тэжээлт орчинд 10% уургийн үхрийн ийлдэс нэмэн, 5%-ийн CO_2 -ийн агууламжтай 37^{0}C-ийн орчинд өсгөвөрлөж, 4-5 удаагийн сэлгэн зорчуулсны дараа туршилтанд ашигласан[7]. Загварыг боловсруулахдаа HEp-2 эсийн уургийг ашиглах, HEp-2 эсийг бүхлээр ашиглах гэсэн хоёр төрлийн арга зүйгээр туршин үзэв.

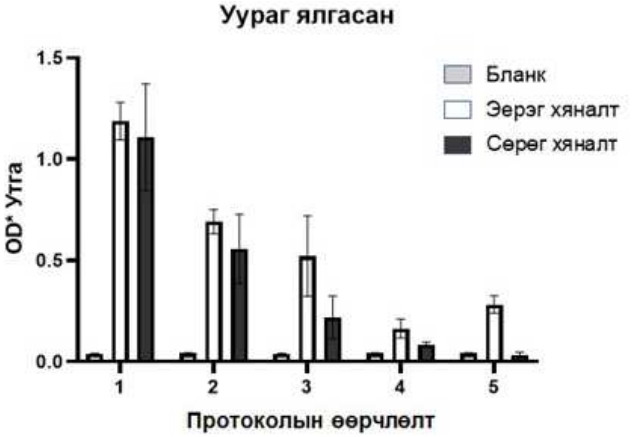
HEp-2 эсийн уургийг ялган, ашигласан арга зүй: Эсийг задлагч буфер (RIPA lysis buffer) ашиглан задалж эсийн антиген агуулсан хэсэг болох супернатант хэсгийг цуглуулж, концентрацийг бицинхониний хүчлийн цомгоор (Pierce BCA Protein Assay Kit) тодорхойлов. Уургийн бэхлэлтийг фосфатын буфержуулсан давсны уусмал (PBS) болон карбонат буфер гэсэн уусмал ашиглан ФХЭБУ-ын хавтанд (1 үүрт - 5mcg/ml) хийж 4^{0}C-д шөнийн турш инкубацлав. Өвөрмөц бус холболтыг саатуулахын тулд тугалын ийлдсийн альбумин (BSA)-ийг 5%, 10%-ийн концентрациар туршив. Анхдагч эсрэгбиеийн концентацийг 1:10-аас 1:1000 хооронд, хоёрдогч эсрэгбиеийн концентацийг 1:10,000-аас 1:30,000 хооронд шингэрүүлэн, инкубаци хийх хугацааг 30 минут, 1 цаг болон 2 цаг тус тус туршин эцсийн үр дүнг гэрлийн шингээлтээр (OD- Optical Density) тодорхойлов[8].

HEp-2 эсийг бүхлээр ашигласан буюу эсэд суурилсан арга зүй: Тогтвортой ургасан эсийг эс тоолуур (Hemocytometer) ашиглан тоолж, өсгөврийн орчноор шингэрүүлэн ФХЭБУ-ын хавтанд (1 үүрт– 20,000 эс) сэлгэн 5%-ийн CO_2 -ийн агууламжтай 37^{0}C-ийн орчинд 24 цаг өсгөвөрлөв[9-10]. Эсийн бэхжүүлэлтийг 1%, 4%-ийн параформальдегид (PFA) болон 1:1 метанол-ацетон ашиглан өрөөний температурт 10 минут, 15 минут, 20 минут тус тус бэхжүүлж туршив. Эсийн ханыг Triton X100 ашиглан нүхэлж, эндоген пероксидазыг 0.06%, 0.1%, 0.3% болон 0.5%-ийн концентрацийн quenching буфер ашиглаж хориглов. Өвөрмөц бус холболтыг саатуулахын тулд 10%-ийн тугалын ийлдсийн альбумин (BSA) болон 5%-ийн skim milk ашиглав[11]. Анхдагч эсрэгбиеийн концентацийг 1:10-аас 1:1000 хооронд, хоёрдогч эсрэгбиеийн концентацийг 1:10,000-аас 1:20,000 хооронд шингэрүүлэн, инкубаци хийх хугацааг 30 минут, 1 цаг болон 2 цаг тус тус туршин эцсийн үр дүнг гэрлийн шингээлтээр (OD- Optical Density) тодорхойлов.

ANA эерэг эсвэл сөрөг болох тодорхойлогдсон ийлдсийг УНТЭ-ийн Хэрх үе судлал, үе сэргээх төвийг түшиглэн цуглуулж хяналт болгон ашиглав.

Үр дүн: Хоёр төрлийн арга зүйгээр боловсруулж буй ФХЭБУ-ын үр дүнд антигенийг урвалын самбарт бэхлэх, өвөрмөц бус холболтыг саатуулах, анхдагч ба хоёрдогч эсрэгбиеэр үйлчлэх концентраци, хугацаа зэрэг нөлөөлж байв.

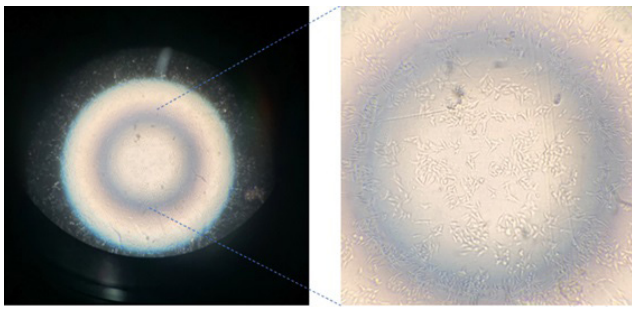
HEp-2 эсээс ялгасан уургийг ашигласан үр дүн: Уураг ашигласан загварын үр дүнгийн эерэг болон сөрөг хяналтын утгын зөрүү ойрхон тодорхойлогдсон ба статистик ач холбогдол бүхий ялгаагүй ($p>0.05$) тодорхойлогдов. HEp-2 эсийн уургийг ашигласан цомгийн загвар боловсруулалтын OD утгын ялгаатай байдлыг харуулав (Зураг 1).



Зураг 1. Эсийн уургийг ашигласан арга зүйн хяналтын OD утга

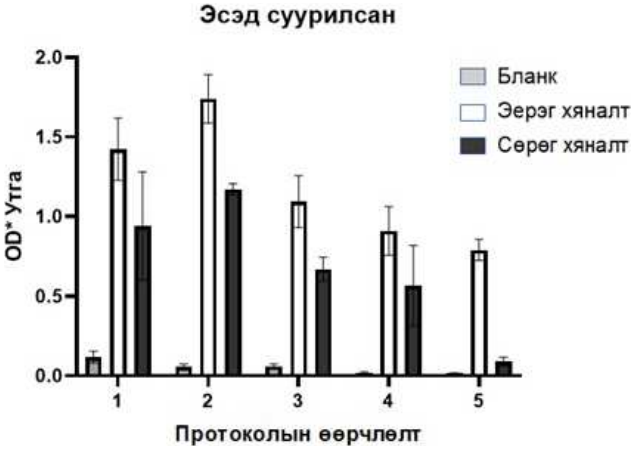
HEp-2 эсийн уургийг ашигласан цомгийн эерэг хяналтын OD утга 3 ба 5 дахь туршилтад өндөр тодорхойлогдов.

HEp-2 эсийг бүхлээр ашигласан үр дүн: HEp-2 эсийг ФХЭБУ-ын хавтангийн үүрэнд амжилттай бэхэлсэн үр дүнг харуулав (Зураг 2).



Зураг 2. Бичил үүрийн ёроолд ургасан HEp-2 эс
A. Гэрлийн микроскопийн 4X өсгөлтөөр харагдах байдал
B. Гэрлийн микроскопийн 10X өсгөлтөөр харагдах байдал

Эерэг болон сөрөг хяналтын OD утгын зөрүүг нэмэгдүүлж буй протоколын оновчтой нөхцөлийг боловсруулав. Үүнд: Урвалын хавтанд бэхлэгдэн ургасан эсийг 1:1 метанол-ацетон ашиглан өрөөний температурт 20 минут бэхжүүлнэ. Эсийн эндоген пероксидазыг 0.1%-ийн quenching буферээр хориглож, 10%-ийн тугалын ийлдсийн альбуминаар өвөрмөц бус холболтыг саатуулна. Анхдагч эсрэгбиеийг 1:300-аар 30 минут, хоёрдогч эсрэгбиеийг 1:20,000-аар 1 цаг үйлчилнэ. HEp-2 эсийг бүхлээр ашиглахад эерэг ба сөрөг хяналтын утгын зөрүү статистик ач холбогдол бүхий ялгаатай ($p<0.0001$) тодорхойлогдов (Зураг 3).



Зураг 3. Эсэд суурилсан арга зүйн хяналтын OD утга

HEp-2 эсийг бүхлээр ашигласан цомгийн эерэг хяналтын OD утга 5 дахь туршилтад статистик ач холбогдол бүхий өндөр ($p<0.0001$) тодорхойлогдов.

Хэлцэмж: Судлаач Н.Стиматти (2023) нар арьсны тархмал хатуурал эмгэгийн үед ауто эсрэгбиеийг илрүүлэх зорилгоор ФХЭБУ-ын загварыг боловсруулахдаа урвалын самбарыг бүрэх антиген, эерэг ба сөрөг хяналтын оновчтой концентрацийг тогтоохын тулд цувралаар шингэлэн туршсан байсан нь бидний боловсруулж буй туршилтын арга зүйтэй адил байв[12]. Энэхүү судалгаанд боловсруулсан ФХЭБУ-ын цомгийн үр дүнг арилжааны цомгийн үр дүнтэй харьцуулсан байсан бөгөөд энэ харьцуулалт нь бидний судалгааны ажлын дараагийн зорилт болж байна. Т.А.Аланджани (2020) нарын хийсэн судалгаанд ФХЭБУ-ын анхдагч эсрэгбиеийг блоклогч буферт 1:100-аас 1:800 хүртэл, тунхууны пероксидаза (Horse-Radish Peroxidase, HRP)-г 1:1000-аас 1:128,000 хооронд тус тус шингэлэн туршсан байна[13].

С.Юрасов (2005) нар HEp-2 эсийн лизатыг антиген болгон ФХЭБУ-аар тогтолцооны улаан яршил эмгэгтэй хүмүүсийн боловсорч гүйцсэн гэнэн В эсийн аутореактив шинжийг тодорхойлоход хяналтын болон эмгэгтэй бүлэг хооронд статистик ач холбогдол бүхий ялгаа ($P=0.0003$; $P=0.009$) тодорхойлогдож байсан байна[14]. Энэ судалгаанд ашигласан эс нь бидний судалгаанд ашигласан эстэй адил боловч В эсийн аутореактив шинжийг шинжилснээрээ ялгаатай байна. Ш.И.Ян (2006) нар 32D ба трансфекцитэй 32Dβ шугаман эсэд суурилсан ФХЭБУ-ын загварыг амжилттай боловсруулсан бөгөөд янз бүрийн концентраци, температур, хрН-ийн өөрчлөлт нь эсрэгбиеийг эстэй холбоход хэрхэн нөлөөлж байгааг туршсан нь бидний судалгааны арга зүйтэй адил байна[15].

К.Гонсалес Родригес (2021) нар ANA илрүүлэхдээ гурван төрлийн аргыг хэрэглэсэн бөгөөд иммунофлюресценц аргад HEp-2 эс, ФХЭБУ-ын аргад цэвэршүүлсэн болон Hep-2 эсээс ялгасан бөөмийн болон цитоплазмийн антиген ашигласан байна[16]. Бидний судалгаанд Hep-2 эсийг ФХЭБУ-ын аргад ашигласанаараа ялгаатай байна.

Дүгнэлт: HEp-2 эсийг бүхлээр нь ашиглан эсэд суурилсан арга зүйгээр ийлдсийн ANA-г илрүүлэх ФХЭБУ-ын in-house цомгийн технологийг боловсруулав.

Талархал: Энэхүү судалгааг АШУҮИС-ийн ШУТДС-ийн санхүүжилттэй “Аутоиммун эмгэгийн оношилгооны ФХЭБУ-ын оношлуур үйлдвэрлэх” сэдэвт төслийн хүрээнд хийж гүйцэтгэв. Судалгааг гүйцэтгэхийг дэмжин, хамтран ажилласан Био-Анагаахын хүрээлэнгийн хамт олонд талархал илэрхийлье.

Ном зүй:

1. *Nosal RS, Superville SS, Amraei R, Varacallo M. Biochemistry, Antinuclear Antibodies (ANA). In: StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; December 29, 2022.*
2. *Grygiel-Górniak B, Rogacka N, Rogacki M, Puszczewicz M. Antinuclear antibodies in autoimmune and allergic diseases. Reumatologia. 2017;55(6):298-304. doi:10.5114/reum.2017.72627*
3. *Ian R. Mackay, Peter J. Delves. Autoimmune Diseases. Encyclopedia of Immunology (Second Edition), Elsevier. 1998; Pages 287-292, ISBN 9780122267659. Doi:10.1006/rwei.1999.0074.*
4. *Cooper GS, Stroehla BC. The epidemiology of autoimmune diseases. Autoimmun Rev. 2003;2(3):119-125. doi:10.1016/s1568-9972(03)00006-5*
5. *Alsaed OS, Alamlih LI, Al-Radideh O, Chandra P, Alemadi S, Al-Allaf AW. Clinical utility of ANA-ELISA vs ANA-immunofluorescence in connective tissue diseases. Sci Rep. 2021;11(1):8229. Published 2021 Apr 15. doi:10.1038/s41598-021-87366-w*
6. *Kumar A, Bansal A, Mahto M, et al. The Role of Indirect Immunofluorescence (IIF) and Line Immunoassay (LIA) in the Diagnosis of Autoimmune Diseases and Their Clinical Correlation: An Observational Study From a Tertiary Care Center in Bihar. Cureus. 2023;15(10):e47702. Published 2023 Oct 26. doi:10.7759/cureus.47702*
7. *Chang JW, Kim S, Lee EY, Leem CH, Kim SH, Park CS. Cell-cell contacts via N-cadherin induce a regulatory renin secretory phenotype in As4.1 cells. Korean J Physiol Pharmacol. 2022;26(6):479-499. doi:10.4196/kjpp.2022.26.6.479*

8. Butler JE, Ni L, Nessler R, et al. The physical and functional behavior of capture antibodies adsorbed on polystyrene. J Immunol Methods. 1992;150(1-2):77-90. doi:10.1016/0022-1759(92)90066-3
9. https://www.sigmaaldrich.com/MN/en/technical-documents/protocol/protein-biology/elisa/elisa-protocols
10. J.M. Centanni, Sowmya Viswanathan, Peiman Hematti. Preclinical Animal Testing Requirements and Considerations. Mesenchymal Stromal Cells. Academic Press.-2017. Pages 37-60. ISBN 9780128028261. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802826-1.00002-7.
11. Xiao Y, Isaacs SN. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and blocking with bovine serum albumin (BSA)--not all BSAs are alike. J Immunol Methods. 2012;384(1-2):148-151. doi:10.1016/j.jim.2012.06.009
12. Sthitmatee N, Tankaew P, Modethed W, et al. Development of in-house ELISA for detection of antibodies against lumpy skin disease virus in cattle and assessment of its performance using a bayesian approach. Heliyon. 2023;9(2):e13499. Published 2023 Feb 4. doi:10.1016/j.heliyon.2023.e13499
13. Alandijany TA, El-Kafrawy SA, Tolah AM, et al. Development and Optimization of In-house ELISA for Detection of Human IgG Antibody to SARS-CoV-2 Full Length Spike Protein. Pathogens. 2020;9(10):803. Published 2020 Sep 28. doi:10.3390/pathogens9100803
14. Yurasov S, Wardemann H, Hammersen J, et al. Defective B cell tolerance checkpoints in systemic lupus erythematosus. J Exp Med. 2005;201(5):703-711. doi:10.1084/jem.20042251
15. Yang XY, Chen E, Jiang H, et al. Development of a quantitative cell-based ELISA, for a humanized anti-IL-2/IL-15 receptor beta antibody (HuMikbeta(1)), and correlation with functional activity using an antigen-transfected murine cell line. J Immunol Methods. 2006;311(1-2):71-80. doi:10.1016/j.jim.2006.01.014
16. González Rodríguez C, Fuentes Cantero S, Pérez Pérez A, Vázquez Barbero FJ, León Justel A. Comparison of the analytical and clinical performances of two different routine testing protocols for antinuclear antibody screening. J Clin Lab Anal. 2021;35(9):e23914. doi:10.1002/jcla.23914

A developmental study of an in-house ELISA kit for the detection serum ANA

Munkhjargal D[1], Ulziikhuu T[1], Urangoo B[1], Ariunzaya M[1], Khashchuluun S[1], Chimidtseren S[1], Khulgun E[2], Margad-Erdene E[2], Gansukh Ch[1], Khongorzul T[1,3]

[1]Department of Immunology, School of Biomedicine, MNUMS
[2]Center for Rheumatology, The First Central Hospital of Mongolia
[3]Laboratory of Immunobiology, Institute of Biomedical Sciences, MNUMS
E-mail: moogii.monkhjargal04@gmail.com, Tel: +976-99303080

Background: The production of ANA (Anti-Nuclear Antibody) occurs through an autoimmune mechanism that targets the DNA, RNA, and histone proteins of one's own cells. The detection of ANA in serum is a diagnostic marker in autoimmune diseases, and the development of an in-house ELISA has clinical and economic value.
Aim: To develop an in-house ELISA kit for serum ANA detection.
Materials and Methods: The HEp-2 cell line, rich in diverse cellular antigens, served as the antigen source. Two methodologies were explored: utilizing whole cells and isolated cell-derived proteins. In the former, 20,000 cells per well were employed, while the latter utilized proteins isolated from cells at a concentration of 5µg/ml per well. Serum samples categorized as positive or negative for ANA were obtained as primary antibodies from the Center for Rheumatology of the First Central Hospital of Mongolia. The ELISA procedure involved measuring Optical Density (OD) values using primary and secondary antibodies.
Results: The developed in-house ELISA kits using both methodologies were influenced by various factors including antigen binding, non-specific binding inhibition, and antibody exposure duration. A refined protocol was devised, augmenting the disparity in OD values between positive and negative controls. The difference between the positive and negative control values of the model using protein was close and there was no statistically significant difference ($p>0.05$). The difference in OD values between the positive and negative controls using HEp-2 cell protein increased in experiments 3 and 5. Optimal protocol conditions were developed that maximized the difference between the OD values of the positive and negative controls including fix the cells attached to the reaction plate with 1:1 methanol-acetone for 20 minutes at room temperature. Cell endogenous peroxidase was inhibited with 0.1% quenching buffer, and nonspecific binding was inhibited with 10% calf serum albumin. Primary antibody at 1:300 for 30 minutes and secondary antibody at 1:20,000 for 1 hour. There was a statistically significant difference ($p<0.0001$) between the positive and negative control values using whole HEp-2 cells.
Conclusion: We successfully developed an in-house ELISA kit technology for the detection of serum ANA by HEp-2 cell-based ELISA methodology.

Keywords: Cell line, cell-based ELISA, Autoimmune, HEp-2 cell